Резюме: Поводом для разработки метода эндоскопически ассистированного оперативного вмешательства по гастропексии желудка в брюшной полости послужила излишняя травматичность традиционной метода при плановой профилактической гастропексии у животных из группы риска к завороту желудка у собак. Ввиду высокой актуальности малоинвазивных методов хирургии брюшной полости у собак мы пришли к выводу, что выполнение эндоскопически ассистированного оперативного вмешательства при хирургической профилактике заворота желудка у собак будет отвечать всем требованиям.

SUMMARY
The reason for the development of the method of endoscopically assisted surgical intervention on gastropexy stomach into the abdominal cavity was too traumatizing traditional gastropexy of this method with the planned preventive gastropexy in animals at risk to dilatation of the stomach in the dogs. In view of the high relevance of the low-invasive methods of surgery of the abdominal cavity in dogs we came to the conclusion that the implementation of endoscopically assisted surgical intervention in the prevention of surgical my twisted stomach of the dog will meet all requirements.

Keywords: dog, gastric volvulus, gastropexy, laparoscopy.

Литература

. Kersey R. Handbook of Small Animal Gastroenterology.WB Saunders. USA, 2003.

2. Hall T.J. Flexible endoscopy: upper gastrointestinal tract/ in BSAVA Manual of Canine and Feline Endoscopy and Endosurgery. Edited by P. Lhermette and D. Sobel, 2008. p. 42-72.

3. Lhermette Ph., Sobel D. Canine and Feline Endoscopy and Endosurgery. BSAVA, 2008, Stephens @ George Ltd, 234 S

4. Tams T.R. Gastroscopy. In Tams TR, ed: Small animal endoscopy, ed 3, St. Louis, 2011,Mosby.

5. Волков А.А., Салаутин В.В., Карташов С.Н. Клинико-морфологическая классификация гастритов у собак. – Краснодар. – Ветеринария Кубани, № 6, 2009. – с. 23-28.

Контактная информации об авторах для переписки

Позябин Сергей Владимирович , доцент кафедры ветеринарной хирургии ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, 8-903-749-25-22

УДК 619:616-07

Козырева Н.Г.
(ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (ВИЭВ)

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ МЕТОДИКИ ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ПРОВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРС В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Ключевые слова: КРС, вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), ПЦР, чувствительность, специфичность

Введение

Лейкоз крупного рогатого скота – хроническое инфекционное заболевание сельскохозяйственных животных, вызываемое ретровирусом – вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС, bovine leukemia virus, BLV). ВЛКРС принадлежит роду Deltaretrovirus семейства Retroviridae, к которому также относятся и вирусы Т-клеточной лейкемии человека (HTLV).

Для детекции ВЛКРС инфекции возможно использование ПЦР как высоко чувствительного и специфичного молеку-

лярно-биологического метода прямого обнаружения возбудителя, в качестве дополнительного в сочетании с серологическими методами диагностики для обследования серонегативных животных в неблагополучных по лейкозу хозяйствах, телят в возрасте до 6 месяцев, а также при исследовании импортированных и племенных животных.

Цель работы – определение чувствительности и специфичности сконструированной тест-системы для выявления ДНК провируса ВЛКРС.

Материалы и методы

Материалом исследований. Для отработки методики использовались образцы крови КРС. Взятие образцов крови производили из хвостовой вены животных одноразовыми стерильными системами («Vacuette», Австрия) в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА или цитрат-натрия (3,8%)). Обследовались коровы и телки красной степной, черно-пестрой пород из хозяйств Калужской, Ростовской, Московской областей. Всего проанализировано 290 образцов ДНК провируса лейкоза КРС.

В качестве положительного контроля ПЦР использовали рекомбинантный положительный контрольный образец (ПКО) ДНК ВЛ КРС. Препарат представляет собой генно-инженерную конструкцию - плазмиду pBLVpol, несущую вставку фрагмента гена pol размером 438 п.о. Создание ПКО ДНК ВЛКРС осуществляли методом клонирования (работа проводилась на базе ФГУП «ГосНИИгенетика», Москва).

Экстракцию ДНК из 100 мкл цельной крови проводили методом преципитации НК спиртом с помощью набора реагентов «Рибо-преп» отечественного производства согласно инструкции производителя. ДНК элюировали в 50 мкл ТЕ-буфера.

Проведение анализа. Отработку методики идентификации фрагмента гена pol провируса лейкоза КРС методом ПЦР осуществляли с использованием разработанных праймеров PF2/PR2.

Реакционная смесь объемом 25 мкл, содержала: по 10 пмоль каждого праймера (PF2/PR2); 3 мМ MgCl2 , 5 ед. полимеразы Taq; 10 мМ дНТФ, 5 мкл ДНК-матрицы.

Амплификацию проводили в программируемом термоциклере «Терцик» по следующей программе: 95 С – 3 мин; затем в 35 циклов – 94 С – 20 сек, 62 С – 30 сек, 72 С – 1 мин; 72 С – 3 мин.

По окончанию амплификации ПЦР-продукт в объеме 10 мкл анализировали путем электрофоретического разделения в 2% агарозном геле с маркером молекулярных масс Gene Pak DNA Ladder M100. Агарозный гель окрашивали бромистым этидием (конечная концентрация 0,5 мкг/мл). Результаты гель-электрофореза регистрировали с помощью системы гельдокументирования PowerShot A510.

Для определения чувствительности ПЦР тест-системы методом лимитирующих разведений (2) были проанализированы 10-кратные и 5-кратные пограничные разведения ПКО ДНК ВЛКРС. Результаты анализа обработаны с помощью компьютерной программы QUALITY (1).

Результаты и обсуждение

Результаты филогенетического анализа (неопубликованные данные) подтвердили, что данный участок гена pol является высоко консервативным (выявлено до 6% расхождения в нуклеотидных последовательностях), что послужило преимуществом при использовании его в качестве диагностической мишени для разработки тест-системы.

В процессе ПЦР в положительных образцах были получены продукты амплификации ДНК провируса лейкоза КРС длиной 438 п.о., что подтверждалось во всех экспериментах. Это свидетельствовало о воспроизводимости результатов проведенных опытов. Электрофореграмма результатов ПЦР представлена на Рисунке 1.

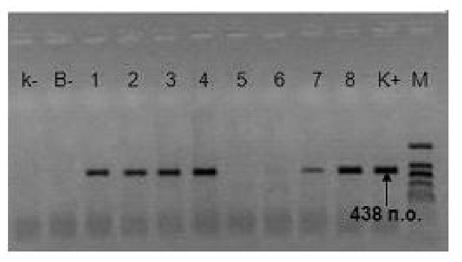


Рис.1. Электрофореграмма результатов ПЦР

М - маркер молекулярных масс;

1-4,7,8 – положительные образцы в ПЦР;

5,6 – отрицательные образцы в ПЦР;

K+ –положительный контроль ПЦР (ПКО ДНК ВЛКРС);

К- – отрицательный контроль ПЦР (вода).

В- – отрицательный контроль этапа выделения (ОКО).

Анализ результатов ПЦР оценивали по прохождению амплификации контрольных образцов. В электрофоретической дорожке, соответствующей положительному контролю (К+), присутствовала светящаяся полоса. Ее электрофоретическая подвижность соответствовала длине ампликона 438 п.о. В электрофоретической дорожке, соответствующей отрицательному контролю (К-), такая полоса отсутствовала. Опытные пробы анализировали по наличию в соответствующей дорожке специфической полосы, которая располагалась на том же уровне, что и полоса в положительном контрольном образце. В электрофоретических дорожках 1-4,7,8 присутствовала специфическая полоса на уровне полосы в дорожке К+, что свидетельствовало о наличии провирусной ДНК ВЛКРС. В электрофоретических дорожках 5,6 специфическая полоса на уровне полосы в дорожке К+ не детектировалась, что свидетельствовало об отсутствии провирусной ДНК ВЛКРС.

Чувствительность методики определяли методом предельных 10-кратных и 5-кратных пограничных разведений ПКО ДНК ВЛКРС. При постановке ПЦР с 10-кратными разведениями ПКО каждое разведение тестировали в 2 повторах. Последним 10-кратным разведением, в котором обнаруживали специфический продукт реакции на электрофореграмме, было разведение 101 м.к./мкл, что составляло 104 м.к./мл. Далее выбирали два последних разведения ПКО, дающих позитивный результат в ПЦР и первое разведение, дающее негативный результат и готовили 5-кратные разведения.

При постановке ПЦР с 5-кратными разведениями ПКО готовили шесть линеек независимых разведений, каждое разведение анализировали в 5 повторах. Для каждого ряда разведений ставили отрицательный контроль ПЦР. Полученные результаты в ПЦР обрабатывали при помощи программы QUALITY, анализируя каждую линейку разведений как независимый эксперимент. По результатам проведенного ПЦР анализа 5-кратных разведений ПКО ВЛКРС минимальное значение концентрации исследуемой ДНК, детектируемое в ПЦР, составляло 1,17х104 м.к./мл или 58,5 м.к./ПЦР.

Для проверки специфичности метода использовали: полевые образцы, содержащие ДНК провируса иммунодефицита КРС (BIV), вируса артрита-энцефалита коз и овец (CAEV); музейные штаммы микроорганизмов из коллекции ГНУ ВНИИВВиМ (г.Покров): штамм Висна К-796, штамм Маэди М-88, штамм артрита-энцефалита коз Тверской 75G-63; образцы ДНК, выделенные от интактных и серонегативных коров. При анализе данных образцов в ПЦР неспецифических реакций не выявляли.

Выводы

1. Испытана эффективная тест-система для диагностики ДНК провируса лейкоза КРС.
2. Проведенные исследования подтвердили высокие показатели чувствительности и специфичности разработанной тест-системы.
3. Для подобранной пары праймеров сконструирован положительный контрольный образец, с помощью которого контролируется работа праймеров.
4. По результатам работы созданы методические наставления по исследованию биологического материала с целью обнаружения ДНК провируса лейкоза КРС методом ПЦР.

Благодарность

Автор выражает благодарность лаборатории «Биофизика» ГНУ ВНИИВВиМ (г.Покров), лаборатории генетики бактерий ФГУП «ГосНИИгенетика» (г.Москва) за помощь в работе

Резюме: Целью настоящей работы служило определение специфичности и чувствительности метода ПЦР для детекции провируса лейкоза КРС в образцах крови, полученных от животных из хозяйств Московской, Калужской и Ростовской областей. Полученные результаты подтвердили высокие показатели чувствительности и специфичности разработанной тест-системы.

SUMMARY

The purpose of the research was to determine the sensitivity and specificity of PCR technique for detection BLV provirus in blood samples of cattle from farms of the Moscow, Kaluga, Rostov regions. The results of the conduct testing proved a high characteristics of sensitivity and specificity of designed PCR test kit.

Keywords: cattle, bovine leukemia virus (BLV), PCR, sensitivity, specificity.

Литература

1. Rodrigo, A.G., Goracke P.C., Rowhanian K., Mullins J. I. Quantitation of target molecules from PCR-based limiting dilution assays.// Human Retrovir.- 1997.- V.13.- p.737-742.

2. Taswell, C.. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies.// J. Immunol.- 1981.-V.126.- p.1614-1619.

Контактная информации об авторах для переписки

Козырева Наталия Геннадиевна, младший научный сотрудник, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (ВИЭВ). Адрес: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, М.т.: 89151137500, E.mail: nk07-73@mail.ru.

УДК 619.616.98

Александров И.Д.
(Донской ГАУ)

ОСНОВА В БОРЬБЕ С ЛЕЙКОЗОМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Ключевые слова: телята, лейкоз, иммунная система, профилактика

Введение.

Проблема лейкоза крупного рогатого скота широко обсуждается в научной литературе и практической ветеринарной медицине. Установлено распространение его во всех регионах России. Изучены микробиологические, биохимические и клинические аспекты процесса. Апробированы многочисленные варианты борьбы с данной инфекционной патологией.

Доказано, что вирус лейкоза легко преодолевает плацентарный барьер и у новорожденных животных уже в первые часы первых суток жизни возбудитель находится в крови. Вирусоносительство при иммунодефиците сохраняется продолжительный промежуток времени (до года и более). При сопутствующих обстоятельствах (нарушения зоогигиенических норм кормления и содержания, влияние стресс-факторов и т.д.) к вирусоносительству добавляются биохимические и, затем, морфологические дефициты с развитием клинического лейкозного процесса, проявляющегося опухолевыми изменениями во внутренних органах. Широко апробированы гематологический метод диагностики больных, серологическая диагностика (РИД) и молекулярно-биологические (ПЦР) методы выявления вирусоносительства. Вирусоносительство сохраняется у животных в течение полного жизненного цикла. При этом диагностические исследования не всегда сопровождаются положительными реакциями на лейкоз. Выпадение положительных серологических реакций при вирусоносительстве – объективная сторона лейкозного процесса. Многочисленные попытки фармакокоррекции при различных формах лейкозного процесса не принесли исследователям желаемого позитивного результата. Природа выпадения серологических и других реакций у вирусоносителей окончательно не установлена, что лишь сдерживает, но не ослабляет клинико-морфологическое течение лейкозного процесса, в борьбе с которым только организационно-хозяйственные мероприятия выполняют лишь паллиативную роль.

Обзор результатов собственных исследований.

Нами неоднократно указывался перспективный путь борьбы с данной инфекцией (И.Д.Александров, 2001,2002,2003,2007,2008,2009), основанный на использовании иммунокорректоров.

Специфика ведения сельскохозяйственного производства в Российской Федерации в зоне рискованного земледелия, изобилующего биогеохимическими провинциями с природными дефицитами важнейших микроэлементов, обуслов-